

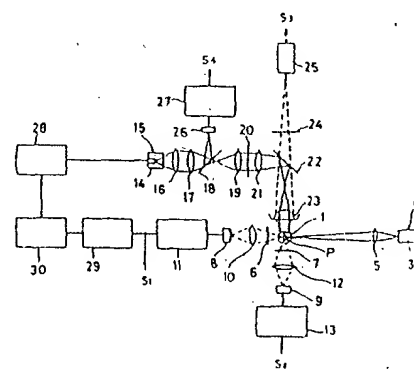
CLIENT COPY

(54) LIGHT SOURCE DEVICE FOR IRRADIATING CELL IN AUTOMATIC ANALYSIS INSTRUMENT FOR CELL

(11) 60-260830 (A) (13) 24.12.1985 (19) JP
 (21) Appl. No. 59-117551 (22) 7.6.1984
 (71) FUJISAWA YAKUHIN KOGYO K.K. (72) KIYOSHI HATSUTORI(2)
 (51) Int. Cl. G01N21/64

PURPOSE: To enable high-brightness excitation and to obtain high fluorescent sensitivity by lighting a flash lamp of a light source for excitation of fluorescence when the arrival of a cell at a measuring position is detected.

CONSTITUTION: The beam from a semiconductor laser 3 irradiates continuously the measuring position P and the cells in the coaxial laminar flow in a flow cell 1 flows by each piece downward by passing through the position P. A forward scattering signal S_1 and a '90° scattering signal S_2 increase instantaneously when the cell passes through the position P. The information on the size of the cell is obtd. by the signal S_1 and the information on the internal structure of the cell is obtd. by the signal S_2 . A cell detecting circuit 29 monitors at all times the signal S_1 and outputs the cell detection signal when the S_1 exceeds a trigger level. A xenon flash lamp 14 is instantaneously lighted by the signal. The fluorescence emitted from the cell enters a photomultiplier 25 by passing through a fluorescence selecting filter 24 and generates a fluorescence signal S_3 .



11,13,27: amplifier circuit, 28: power source for lamp, 29: trigger circuit, S_3 : compensation signal

⑨ 日本国特許庁(JP)

⑩ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A) 昭60-260830

⑬ Int. Cl.⁴
G 01 N 21/64

識別記号

庁内整理番号
7458-2G

⑭ 公開 昭和60年(1985)12月24日

審査請求 未請求 発明の数 1 (全6頁)

⑮ 発明の名称 細胞自動分析装置における細胞照射光源装置

⑯ 特 願 昭59-117551

⑰ 出 願 昭59(1984)6月7日

⑱ 発明者	服 部 清	宝塚市逆瀬台3-3-17
⑱ 発明者	西 山 太 一 郎	大阪市城東区東中浜9-7-6
⑱ 発明者	酒 井 文 彦	吹田市桃山台5-1-C20-813
⑲ 出 願 人	藤沢薬品工業株式会社	大阪市東区道修町4丁目3番地
⑳ 代 理 人	弁理士 岸本 瑛之助	外4名

明 細 書

1. 発明の名称

細胞自動分析装置における細胞照射光源装置

2. 特許請求の範囲

(1) 一定の測定位置を通過する同軸搬送中の細胞に光を照射しこのときに発生する蛍光により細胞を分析する機能を少なくともも有する細胞自動分析装置において、フラッシュランプを使用した蛍光励起用光源と、細胞が測定位置に達したことを検出する細胞検出回路と、細胞検出回路が細胞を検出したときに蛍光励起用光源のフラッシュランプを点灯させるためのトリガ信号を発生するトリガ発生回路とを備えている細胞照射光源装置。

(2) 細胞検出回路が、半導体レーザを使用し、散乱光用光源からの光の強度

によって細胞が測定位置に達したことを検出するものである特許請求の範囲第1項に記載の細胞照射光源装置。

3. 発明の詳細な説明

産業上の利用分野

この発明は、細胞自動分析装置における細胞照射光源装置、さらに詳しくは、医学や生物学などの分野で、病気の診断、治療、研究、細胞の検査、分類などを目的として、少なくとも蛍光特性に基づいて細胞を分析する機能を有する装置において、細胞に蛍光励起用の光を照射するための装置に関する。

従来技術

上記のような細胞自動分析装置として、フローセル内の一定の測定位置を通過する同軸搬送

発明の構成

光を照射し、このときに細胞によって発生する前方散乱光、90度方向散乱光および蛍光に基づいて、細胞の大きさ、内部構造および蛍光特性を調べるものが知られている。アルゴンレーザーは高輝度光源として好適であるが、大形かつ高価であるという問題がある。また、アルゴンレーザーのかわりに高圧水銀灯を用いたものも知られている。高圧水銀灯は、レーザーに比べ、安価であるが、寿命が短く、しかも輝度が低いので、蛍光感度を上げるために開口角の大きな油浸系レンズを使用する必要があり、このために蛍光集光系の光学系を複雑かつ大形にしている。

発明の目的

この発明の目的は、細胞自動分析装置において、小形で蛍光感度が高く、しかも安価で寿命の長い細胞照射光源装置を提供することにある。

側を下とし、同図の左側を前、右側を後、下側を左、上側を右とする。

細胞自動分析装置は、中心部に細胞を閉じ込めた液体を同軸層流の形で上から下に流すための垂直管状のフローセル(1)を備えており、同軸層流中の細胞はフローセル(1)の中心部の一定の測定位置(P)を通過して流れる。測定位置(P)の後方には半導体レーザー(3)を使用した散乱光用光源(4)が配置されており、これから出た半導体レーザー光(波長780または830nmの連続光)はレンズ(5)により測定位置(P)に直径約50μm程度に集光する。測定位置(P)の前方および左側方にそれぞれ遮光板(6)(7)が配置され、前方の遮光板(6)のさらに前方および左側方の遮光板(7)のさらに左側方にそれぞれフォトセル(8)

この発明による細胞照射光源装置は、一定の測定位置を通過する同軸層流中の細胞に光を照射しこのときに発生する蛍光により細胞を分析する機能を少なくとも有する細胞自動分析装置において、フラッシュランプを使用した蛍光励起用光源と、細胞が測定位置に達したことを検出する細胞検出回路と、細胞検出回路が細胞を検出したときに蛍光励起用光源のフラッシュランプを点灯させるためのトリガ信号を発生するトリガ発生回路とを備えているものである。

実施例

第1図は細胞自動分析装置の光学系および電気系の構成を概略的に示しており、光学系はこれを上から見た状態で示してある。なお、以下の説明において、第1図の紙面表側を上、同裏

(9)が配置されている。そして、半導体レーザー光の細胞による前方散乱光はレンズ(10)により前方のフォトセル(8)に集光し、フォトセル(8)の出力は増幅回路(11)を経て前方散乱信号(S₁)として取出される。また、半導体レーザー光の90度方向散乱光はレンズ(12)により左側方のフォトセル(9)に集光し、フォトセル(9)の出力は増幅回路(13)を経て90度方向散乱信号(S₂)として取出される。

測定位置(P)の右斜め前方にキセノンフラッシュランプ(14)を使用した蛍光励起用光源(15)が後向きに配置されており、これから出る光は、レンズ(16)(17)、光軸に対し45度傾けて配置されたガラス板(18)、レンズ(19)、励起用フィルタ(20)およびレンズ(21)を通り、測定位置(P)の右側方に配置

されたダイクロイックミラー(二色性ミラー)(22)で反射したのち、蛍光集光レンズ(23)を通過して測定位置(P)の細胞に照射される。そして、細胞に光を照射したときに発生する蛍光は蛍光集光レンズ(23)、ダイクロイックミラー(22)および蛍光選択フィルタ(24)を通過してフォトマル(光電子増倍管)(25)に集光し、フォトマル(25)の出力が蛍光信号(S_1)として取出される。また、フラッシュランプ(14)から出てレンズ(16)(17)を通過した光の一部はガラス板(18)で反射してフォトセル(26)に集光し、フォトセル(26)の出力は増幅回路(27)を経て補償用信号(S_c)として取出される。一方、前方散乱光用増幅回路(11)とフラッシュランプ(14)のランプ電源(28)との間に、細胞検出回路(29)およびトリガ発

生回路(30)が設けられている。キセノンフラッシュランプ(14)の特性の1例を挙げれば、消費電力15W(ピーク出力300.0W)、連続スペクトル300~800nm、最大繰返し周波数2.5kHz、寿命 10^8 回である。

上記の装置において細胞の分析を行なう場合、半導体レーザー光が連続的に測定位置(P)を照射しており、フローセル(1)内の同軸流中の細胞は1個ずつ測定位置(P)を通過して下方に流れる。フローセル(1)内の液体の流速は約 $10\text{ }\mu\text{m/sec}$ 以下、フローセル(1)内を流れる細胞数は約10,000個/secである。細胞が測定位置(P)を通過するときに、この細胞に半導体レーザー光が照射されて散乱光が生じ、これにより、前方散乱信号(S_1)および90度方向散乱信号(S_2)が瞬時的に増大する

(第2図参照)。そして、前方散乱信号(S_1)の大きさによって細胞の大きさに関する情報が得られ、90度方向散乱信号(S_2)の大きさによって細胞の内部構造に関する情報が得られる。一方、細胞検出回路(29)は前方散乱信号(S_1)を常時監視しており、細胞が測定位置(P)に達して前方散乱信号(S_1)が一定のトリガレベル(L)を超えたときにトリガ発生回路(30)に細胞検出信号を出力する。第2図に示すように、トリガ発生回路(30)は細胞検出信号を受けてランプ電源(28)にトリガ信号を出力し、これにより、キセノンフラッシュランプ(14)が瞬時的に点灯する。この光は蛍光色系に最適な励起用フィルタ(20)を通過したのち、測定位置(P)の細胞に照射する。このとき、細胞から散乱される光は色系による蛍光、

励起光および半導体レーザー光による散乱光であり、これが蛍光のみを選択する蛍光選択フィルタ(24)を通過したのちフォトマル(25)に入射し、蛍光信号(S_2)の大きさによって細胞の蛍光特性に関する情報が得られる。ランプ電源(28)にトリガ信号が入力してからフラッシュランプ(14)が発光を開始するまでの遅延時間は $0.2\text{ }\mu\text{s}$ 程度であり、その他の電子回路の遅れ時間を含めても、前方散乱信号がトリガレベル(L)を超えてからフラッシュランプ(14)が点灯開始するまでの時間(t_1)は $0.5\text{ }\mu\text{s}$ 以下である。また、フラッシュランプ(14)の発光時間(t_2)は $1\sim 15\text{ }\mu\text{s}$ である。そして、細胞が測定位置(P)を通過する時間は前方散乱信号(S_1)がトリガレベル(L)を超えている時間(t_3)と大体等しい。

間(1)は、細胞の大きさにもよるが、前記の条件下では $5\mu s$ 以上である。したがって、細胞が測定位置(P)を通過している間にフラッシュランプ(14)を点灯させて細胞の蛍光特性を調べることができる。また、半導体レーザー光の波長が780または830nmであるのに対して、通常使用される蛍光色素(FITC, PE, PI)の蛍光波長は650nm以下であり、半導体レーザー光と蛍光の波長は十分離れているので、半導体レーザー光の影響はフィルタ(24)で簡単に除去できる。仮に半導体レーザー光の影響が無視できない蛍光色素があったとしても、この場合には、半導体レーザー光の前方散乱信号(S_1)のピーク値を検出したのちにレーザー発振を停止してフラッシュランプ(14)を点灯するようにすれば、前方散乱信号(S_1)がトリ

ガレベル(L)を越えてからピーク値に達するまでの時間が $3\mu s$ 以下で、レーザー発振の立上り、立下り時間が約0.5nsであるから、時間遅れ $3\mu s$ 程度で半導体レーザー光の影響を受けない蛍光信号を検出することができる。また、キセノンフラッシュランプ(14)の光強度の変動(通常10%以下)は蛍光信号(S_0)の大きさに影響するが、蛍光信号(S_0)と補償用信号(S_c)のピーク値の比をとることにより、変動分を補償して正確な測定値を得ることができる。

上記実施例の場合、蛍光励起用電源(15)にキセノンフラッシュランプ(14)を使用しているので、アルゴンレーザーや高圧水銀灯を使用する従来のものに比べて次のような利点がある。すなわち、アルゴンレーザーは発振スペクトル線

が少ないため、通常使用される蛍光色素でもアルゴンレーザーのかわりにクリプトンレーザーやヘリウム-ネオンレーザーを用いなければ十分な蛍光強度が得られない色素も多い。また、高圧水銀灯は輝線スペクトルを含む連続スペクトルを有するが、輝線スペクトルの発光強度が強いため、アルゴンレーザー程ではないが、色素の最適励起波長の選択の問題は残されている。これに対し、キセノンフラッシュランプは連続スペクトルを有するので、測定色素に最適な励起波長を自由に選択することができる。

また、上記実施例の場合、細胞の大きさなどを知るための散乱光用電源(4)に半導体レーザー(3)を使用し、半導体レーザー光の細胞による前方散乱信号(S_1)によって細胞が測定位置(P)に達したことを検出しているため、散

乱光用光源(4)および蛍光励起用光源(15)ならびにこれらの電源を含めても、アルゴンレーザーや高圧水銀灯を使用する従来の光源に比べて、小形で安価であり、しかも寿命が長い。なお、前方散乱信号(S_1)のかわりに90度方向散乱信号(S_2)によって細胞を検出するようにしても、同等の効果が奏される。しかしながら、細胞の大きさなどの検出に必ずしも半導体レーザー光を使用しなくてもよい。たとえば、オリフィスに細胞が流れ込むときに発生するオリフィス間の電気抵抗の変化(電極液による細胞容積信号)によって細胞の大きさを知るようにすることもできる。この場合は、細胞容積信号によって細胞が測定位置に達したことを検出するようにすることができる。

発明の効果

特開昭60-260830(5)

この発明による細胞照射光源装置は、フラッシュランプを使用した蛍光励起用光源と、細胞が測定位置に達したことを検出する細胞検出回路と、細胞検出回路が細胞を検出したときに蛍光励起用光源のフラッシュランプを点灯させるためのトリガ信号を発生するトリガ発生回路とを備えているので、細胞が測定位置を通過するときのみフラッシュランプを点灯させることにより、輝度励起が可能となり、高い蛍光感度が得られる。また、従来のようなアルゴンレーザや高圧水銀灯を使用しなくてもよいので、光源の小形化、低価格化および長寿命化を図ることができる。

図 8、第 2 図はフラッシュランプが点灯するときの前方散乱信号、トリガ発生回路の出力およびフラッシュランプの光出力を示すタイムチャートである。

(14) …キセノンフラッシュランプ、(15)
…蛍光励起用光源、(29) …標識検出回路、
(30) …トリガ発生回路。

以 上

特許出願人 藤沢薬品工業株式会社

代理人 岸本 瑛之助

外 4 名

4. 図面の簡単な説明

図面はこの発明の実施例を示し、第1図は細胞自動分析装置の光学系および電気系の概略構

第 1 圖

